

Biologia Molecular do Processo de Infecção por *Agrobacterium* spp.

Gisele M. de Andrade¹, Laudete M. Sartoretto² & Ana C. M. Brasileiro³

Laboratório de Transferência de Genes, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica, CEP 70849-970, Brasília, DF; ¹Endereço atual: School of Forest Resources, University of Georgia, Athens (GA) – EUA; ²Endereço atual: Laboratório de Biotecnologia Florestal, Departamento de Ciências Florestais, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (RS); ³Endereço atual: Embrapa Labex-France, Cirad-Amis - TA 70/03, Avenue Agropolis, 34.398 Montpellier Cedex 5 – França, Telefone: 00.33.(0)4.67.61.57.35, Fax: 00.33.(0)4.67.61.56.05, e-mail: brasileiro@cirad.fr

(Aceito para publicação em 12/05/2003)

Autor para correspondência: Ana Cristina M. Brasileiro

ANDRADE, G.M., SARTORETTO, L.M. & BRASILEIRO, A.C.M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. Fitopatologia Brasileira 28:465-476. 2003.

RESUMO

Agrobacterium tumefaciens é o agente causal da galha-da-coroa, doença que afeta a maioria das plantas dicotiledôneas e caracteriza-se pelo crescimento de tumores na junção entre o caule e a raiz (coroa). A formação desses tumores é o resultado de um processo natural de transferência de genes de *Agrobacterium* spp. para o genoma da planta infetada. Esses genes estão contidos em um plasmídeo de alto peso molecular (120 a 250 kb), denominado Ti (“tumor inducing”), presente em todas as linhagens patogênicas de *Agrobacterium* spp. Duas regiões do plasmídeo Ti estão diretamente envolvidas na indução do tumor: a região-T, que corresponde ao segmento de DNA transferido para a célula vegetal, e a região de virulência (região *vir*), que contém genes envolvidos na síntese de proteínas responsáveis pelo processo de transferência da região-T. Esta região, uma vez transferida e integrada no genoma da célula vegetal, passa a ser

denominada de T-DNA (“transferred DNA”). Os genes presentes no T-DNA codificam enzimas envolvidas na via de biossíntese de reguladores de crescimento, auxinas e citocininas. A síntese desses reguladores pelas células transformadas causa um desbalanço hormonal, levando à formação do tumor no local da infecção. Outro grupo de genes presentes no T-DNA codifica enzimas responsáveis pela síntese de opinas, que são catabolisadas especificamente pela bactéria colonizadora, como fonte de nutrientes. O conhecimento preliminar das bases moleculares envolvidas no processo de infecção de uma planta hospedeira por *Agrobacterium* spp., permitiu a utilização desta bactéria como vetor natural de transformação genética de plantas.

Palavras-chave adicionais: biovares, oncogenes, opinas, T-DNA, plantas transgênicas, plasmídeo Ti, tumores em plantas.

ABSTRACT

Molecular biology of the infection process by *Agrobacterium* spp.

Agrobacterium tumefaciens is the causal agent of crown gall disease that affects most dicotyledonous plants and is characterized by growth of tumors in the region between the plant stem and root (crown). The development of tumors is the result of a natural transfer process of *Agrobacterium* spp. genes to the genome of the infected plant. These genes are found on a high molecular weight plasmid denominated Ti (tumor inducing), present in all pathogenic *Agrobacterium* spp. strains. Two Ti plasmid regions are directly involved in tumor induction. The T-region, which corresponds to the segment of transferred DNA to the plant cells, and the virulence (*vir*) region, which contains genes involved in the synthesis of proteins

required for T-region transfer. This region, when transferred and integrated to the plant cell genome, is called T-DNA (transferred DNA). The genes present in T-DNA encode enzymes involved in the biosynthesis of plant growth regulators, auxin and cytokinin. The synthesis of these regulators by transformed cells results in a hormonal imbalance, leading to the development of tumors where the infection took place. Another group of genes present in T-DNA encodes enzymes required for opine synthesis, which are specifically catabolised by the colonizing bacterium as the source of nutrients. Preliminary knowledge of the molecular basis involved in the infection process of the host plant by *Agrobacterium* spp. allowed the use of this bacterium as a natural vector for plant genetic transformation.

INTRODUÇÃO

A galha-da-coroa (do inglês *crown gall*) tem-se destacado nos últimos anos entre as doenças bacterianas de plantas, não pela importância econômica dos prejuízos causados por

ela, mas pelo impacto que o estudo dessa doença trouxe para a ciência moderna. Apesar de ser conhecida desde a Antiguidade, somente em 1907, o seu agente etiológico foi descrito pela primeira vez como sendo *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn. Essa doença caracteriza-se pela

formação de galhas na coroa (junção entre o caule e a raiz) ou diretamente nas raízes da planta infetada. O interesse de cientistas trabalhando nos mais diferentes campos da pesquisa por esta doença deveu-se ao fato de que nas galhas vegetais, normalmente causadas por microrganismos ou insetos, a proliferação do tecido vegetal é induzida por um estímulo externo, de natureza química ou mecânica. No caso da galha-da-coroa, as células vegetais infetadas por *Agrobacterium* spp. adquirem a propriedade de multiplicarem-se de maneira autônoma, sem a necessidade de estímulos externos. Inicialmente, os pesquisadores associaram o desenvolvimento da galha-da-coroa ao câncer animal, o que estimulou numerosas pesquisas visando a elucidação dos seus mecanismos de indução e formação. Esses estudos concluíram que a formação da galha-da-coroa é, na realidade, o resultado de um processo natural de transferência de genes da bactéria para a célula vegetal, que passam a sintetizar proteínas que estimulam a divisão celular no sítio de infecção. Os conhecimentos gerados desde então culminaram com um entendimento bastante aprofundado desse parasitismo, sendo considerado atualmente um sistema-modelo para estudos das interações patógeno-hospedeiro em plantas.

A BACTÉRIA

As agrobactérias (*Agrobacterium* spp.) são microrganismos tipicamente do solo e Gram-negativas. Não formam esporos e possuem forma de bacilo, medindo 0,6-1,0 x 1,5-3,0 µm, e com um a seis flagelos peritríquios. Em geral, as agrobactérias são aeróbicas, apresentando o oxigênio como acceptor final de elétrons. Alguns isolados podem ter respiração anaeróbica, em presença de nitrato, outros podem sobreviver em ambientes com baixa tensão de oxigênio, como no interior dos tecidos de plantas hospedeiras. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de 25 a 28 °C, com colônias geralmente convexas, circulares, lisas, apigmentadas ou de coloração levemente creme (Holt *et al.*, 1994).

Dentro do gênero *Agrobacterium* (do grego *agos* = campo e *bakterion* = bastonete), cinco espécies já foram descritas: (i) *A. tumefaciens*, que provoca a doença conhecida como galha-da-coroa; (ii) *A. rhizogenes* (Riker *et al.*) Conn. que causa a síndrome da raiz em cabeleira (do inglês "hairy root"); (iii) *A. rubi* (Hildebrand) Starr & Weiss, que induz tumores em *Rubus* spp.; (iv) *A. vitis* Ophel & Kerr que induz tumores em *Vitis* spp. e (v) *A. radiobacter* (Beijerinck & van Delden) Conn., que são bactérias não-patogênicas. As agrobactérias pertencem à família Rhizobiaceae, que agrupa, entre outros, o gênero *Rhizobium* que são bactérias fixadoras de nitrogênio (Kerstens & De Ley, 1984).

As diferentes espécies do gênero *Agrobacterium* ocorrem em todo o mundo, em quase todos os tipos de solos, cultivados ou não e, especificamente, na rizosfera das plantas contaminadas onde são encontradas nas galhas, nas raízes ou no solo adjacente. Mesmo em solos com elevada incidência da galha-da-coroa, *A. radiobacter* é sempre mais numerosa (de dez a 100 vezes) do que as outras espécies patogênicas. As

agrobactérias são mais encontradas em regiões de clima temperado devido à sua sensibilidade às altas temperaturas (Lippincott *et al.*, 1981).

Mais de 600 espécies vegetais são conhecidamente susceptíveis à infecção por *Agrobacterium* spp., pertencendo, a maioria delas, à classe das Angiospermas dicotiledôneas e Gymnospermas e, mais raramente, às Angiospermas monocotiledôneas (De Cleene & De Ley, 1976). Embora sua incidência seja baixa, a galha-da-coroa pode tomar proporções devastadoras em certas culturas, conduzindo à perda quase total da produção, principalmente em espécies propagadas vegetativamente, como ornamentais, frutíferas e florestais.

No Brasil, os primeiros relatos sobre doenças causadas por espécies de *Agrobacterium* surgiram na década de 70 em Minas Gerais. Neste estado, a galha da roseira surgiu primeiramente em algumas propriedades e depois, devido às práticas agrônômicas adotadas para esta cultura, como a propagação vegetativa e enxertia, ocorreu uma rápida disseminação do patógeno (Romeiro, 1995). Hoje, existem relatos de sérios danos causados por *Agrobacterium* spp. em vários estados do País, especialmente em roseiras (*Rosa* sp.) e videiras (*Vitis vinifera* L.) (Beriam *et al.*, 1996). Entretanto, a galha-da-coroa não é considerada uma doença de importância econômica no Brasil.

Linhagens não-patogênicas de *Agrobacterium* spp. já foram ocasionalmente isoladas de seres humanos, causando infecções em pacientes severamente debilitados. Entretanto, não existem evidências que as agrobactérias sejam patógenos de vertebrados (Dunne *et al.*, 1993; Alnor *et al.*, 1994; Southern Jr., 1996).

BIOVARES

A atual classificação das agrobactérias, baseada apenas na sua fitopatogenicidade, tem um valor taxonômico questionável, pois a virulência de linhagens de *Agrobacterium* spp. é determinada por um plasmídeo conjugativo. Como estes plasmídios podem ser perdidos em situações de estresse ou adquiridos por conjugação bacteriana, alguns autores sugerem que é preferível utilizar a classificação baseada somente nas características determinadas pelo cromossomo. Assim, as espécies de *Agrobacterium* estão subdivididas em pelo menos três biovars, de acordo com suas características bioquímicas, fisiológicas e nutricionais, determinadas pelos genes cromossômicos. Entretanto, a divisão em biovars nem sempre é possível, uma vez que várias linhagens apresentam características intermediárias. Desta forma, nos últimos anos, a classificação das agrobactérias vem sofrendo uma série de críticas e sugestões de alteração, de modo que a taxonomia do gênero *Agrobacterium* continua ainda controversa (Kerstens & De Ley, 1984; Holt *et al.*, 1994; Beriam *et al.*, 1996). Além do que, o recente seqüenciamento completo dos plasmídios Ti e Ri mostrou que os mesmos são altamente conservados, mesmo entre espécies diferentes (Zhu *et al.*, 2000; Moriguchi *et al.*, 2001).

A biovar 1, o maior grupo, compreende a maioria das linhagens de *A. tumefaciens* e de *A. radiobacter*. Estas

linhagens possuem uma grande capacidade de adaptação e podem ser isoladas de diferentes tipos de solo. Já as linhagens pertencentes à biovar 2 são mais exigentes em relação às condições de solo e são restritas em suas associações com as plantas hospedeiras. Neste grupo, encontram-se algumas linhagens de *A. tumefaciens* e um grande número de *A. rhizogenes*. O último grupo, a biovar 3, compreende basicamente *A. vitis* que infeta videira (Ophel & Kerr, 1990). As poucas linhagens identificadas como *A. rubi* apresentam características bioquímicas intermediárias entre as três biovars (Lippincott *et al.*, 1981).

PLASMÍDIO Ti

Agrobacterium tumefaciens é considerada a espécie-tipo do gênero *Agrobacterium* e foi descrita pela primeira vez por Smith e Townsend (1907), como *Bacillus tumefaciens*. Posteriormente, o gênero *Agrobacterium* foi proposto por Conn e enquadrado na família Rhizobiaceae (Conn, 1942). A galha-da-coroa, provocada pela infecção por *A. tumefaciens*, foi primeiramente descrita por Aristóteles e Theophrastus na Antiguidade e é caracterizada pelo crescimento de galhas na raiz ou na coroa da planta (Siemens & Schieder, 1996). Essas galhas, quando isoladas, são capazes de crescer indefinidamente em meio de cultura *in vitro*, sem reguladores de crescimento (White & Braun, 1941). Devido a esta característica, muito semelhante a das células oncogênicas, o interesse em estudar essas galhas aumentou enormemente, visando descobrir os mecanismos moleculares e celulares envolvidos no crescimento incontrolado de células e, conseqüentemente, possibilitar o desenvolvimento de novos remédios e terapias para o câncer animal (Hooykaas & Schilperoort, 1992). Entretanto, os estudos realizados demonstraram que a formação de galhas induzidas por *A. tumefaciens* estava diretamente associada à presença de um plasmídeo de alto peso molecular (120 a 250 kb), denominado plasmídeo Ti (do inglês “tumor inducing”). Este plasmídeo está presente somente em linhagens patogênicas de *Agrobacterium* spp., em um baixo número de cópias, e podem ser transferidos via conjugação para outras bactérias (Hamilton & Fall, 1971; van Larebeke *et al.*, 1974; Zaenen *et al.*, 1974; Watson *et al.*, 1975).

Na década de 70, a descoberta de que a indução das galhas por *Agrobacterium* spp. era resultante de um processo natural de transferência de genes do plasmídeo Ti para o genoma da planta infetada, deu um novo incentivo às pesquisas nesta área (Stafford, 2000). Assim, duas regiões no plasmídeo Ti envolvidas diretamente no processo de indução tumoral foram identificadas (Figura 1): a região-T, que corresponde ao segmento de DNA transferido para a célula vegetal, e a região de virulência (região vir), que contém genes envolvidos na síntese de proteínas responsáveis pelo processo de transferência da região-T (Stachel & Nester, 1986).

A região-T é delimitada por seqüências repetidas de 25 pb, conhecidas como extremidades direita e esquerda, e, uma vez integrada no genoma da célula vegetal, passa a ser denominada T-DNA (do inglês “transferred DNA”). Os genes

presentes no T-DNA passam então a expressar-se, codificando enzimas envolvidas na via de biossíntese de reguladores de crescimento (auxinas e citocininas). A expressão destes genes interfere no balanço hormonal das células transformadas, resultando na sua multiplicação descontrolada, levando, assim, à formação da galha, ou tumor, nos sítios infetados da planta (Tzfira & Citovsky, 2000; Zupan *et al.*, 2000).

O T-DNA também possui genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de opinas, que são compostos formados pela condensação de aminoácidos ou carboidratos modificados e que serão catabolisadas somente pela linhagem indutora, como fonte de nutrientes. Desta forma, as células transformadas pelo T-DNA continuam dividindo-se incontroladamente devido à produção de citocininas e auxinas e, quanto mais elas dividem-se, mais elas produzem opinas que vão sendo utilizadas pela bactéria indutora, formando um nicho extremamente favorável a ela (Binns *et al.*, 1992; Hooykaas & Beijersbergen, 1994).

Além da região-T e da região vir, três outras regiões funcionais, não envolvidas diretamente no processo de indução tumoral, foram também identificadas no plasmídeo Ti, são elas (Figura 1): (i) região de replicação (região rep), que contém a origem de replicação e funções ligadas à manutenção do plasmídeo Ti dentro da bactéria (estabilidade), controle do número de cópias e incompatibilidade entre bactérias; (ii) região de absorção e catabolismo de opinas (região opc), envolvida na síntese de enzimas específicas responsáveis pela absorção das opinas para dentro da célula e posterior catabolismo das mesmas pela bactéria, e (iii) região de transferência conjugativa (regiões tra e trb), responsável pela transferência conjugativa do plasmídeo Ti entre linhagens de *Agrobacterium* spp. ou para outras bactérias Gram-negativas. A maioria dessas regiões é altamente conservada entre os diferentes tipos de plasmídeo Ti, principalmente aqueles pertencentes à mesma classe de opinas.

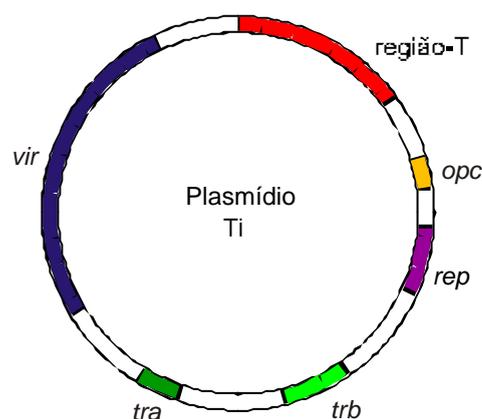


FIG. 1 - Representação esquemática da organização de um plasmídeo Ti. As regiões ilustradas correspondem: (vir) região de virulência; (tra e trb) região de transferência conjugativa; (rep) região de replicação; (opc) região de catabolismo de opinas e (região-T) região transferida para a célula vegetal. O tamanho e a posição relativa de cada região varia segundo a linhagem de *Agrobacterium* sp. (Zhu *et al.*, 2000).

Essas cinco regiões cobrem aproximadamente dois terços do plasmídeo Ti (Figura 1). No restante do plasmídeo, novos genes foram identificados, incluindo genes homólogos ao *murT*, *nodQ* e *ligE*, que estão provavelmente ligados à determinação do espectro de hospedeiro (Suzuki *et al.*, 2000). O plasmídeo Ti também possui genes reguladores (repressores, antagonistas, ativadores, etc.) que codificam proteínas que vão regular a expressão de outros genes do plasmídeo Ti. A presença de elementos IS (*Insertion Sequences*) no plasmídeo Ti também foi relatada, embora a transposição desses elementos ainda não tenha sido demonstrada experimentalmente (Zhu *et al.*, 2000). Existem ainda outras funções presentes no plasmídeo Ti que ainda não são conhecidas, mas que, provavelmente, não estão diretamente envolvidas no processo de desenvolvimento do tumor (Hooykaas & Schilperoort, 1992; Hooykaas & Beijersbergen, 1994).

TRANSFERÊNCIA DA REGIÃO-T PARA A CÉLULA VEGETAL

Indução do sistema de virulência

O processo de infecção e transferência da região-T para a célula vegetal ocorre em diferentes etapas (Figura 2). A primeira delas inicia-se pelo reconhecimento e fixação da bactéria no tecido vegetal lesado por tratos culturais, geadas ou insetos. As agrobactérias são atraídas em direção à célula vegetal por quimiotactismo positivo em relação a moléculas-sinal (essencialmente compostos fenólicos, aminoácidos e monossacarídeos) que são exsudadas pelas células da planta ferida (Tzfira & Citovsky, 2000). Uma vez em contato com a célula vegetal, as bactérias sintetizam filamentos de celulose que estabilizam a ligação inicial, propiciando uma melhor fixação entre a bactéria e a célula hospedeira (Matthysse *et al.*, 2000). Desta forma, a motilidade e o quimiotactismo têm um papel fundamental no processo inicial de infecção, visto que, sem o contato bactéria-célula vegetal, o evento de transferência de DNA não ocorreria (Winans, 1992; Sheng & Citovsky, 1996).

Acredita-se que existam receptores específicos para *Agrobacterium* spp. na superfície da célula da planta, pois um número finito de agrobactérias é capaz de ligar-se a estas células. Além disso, outros gêneros de bactérias não são capazes de competir por esses sítios de ligação. Os genes envolvidos na interação agrobactéria-célula vegetal estão localizados no cromossomo da agrobactéria e incluem *chvA*, *chvB*, *pscA* (ou *exoC*), *att*, *chvD*, *chvE*, *miaA*, *ros*, *chvG*, *chvI* e *acvB*. Mutações em qualquer um desses loci, interferem na ligação agrobactéria-célula vegetal e resultam em linhagens incapazes de infetar plantas (Matthysse & McMahan, 1998; Gelvin, 2000). Outras proteínas e carboidratos da superfície celular vegetal estão, provavelmente, envolvidos na interação com *Agrobacterium* spp. Entretanto, a identidade destes receptores ainda não foi determinada (Hooykaas & Beijersbergen, 1994; Sheng & Citovsky, 1996).

Estando a ligação inicial estabilizada, as moléculas-sinal exsudadas em resposta ao ferimento da planta vão também ativar a expressão dos genes de virulência que estão localizados

na região *vir* do plasmídeo Ti. A região *vir* é formada por um conjunto de seis a mais operons (conhecido como regulon *vir*), contendo, aproximadamente, 34 genes no total. Os operons da região *vir* são co-regulados por duas proteínas da própria região *vir*, *VirA* e *VirG*, que são induzidas, de maneira coordenada, em resposta a estímulos químicos (moléculas-sinal). Isso significa que, após o reconhecimento extracelular, o sinal químico é convertido em uma resposta intracelular.

A primeira demonstração da indução dos genes *vir* por diferentes compostos exsudados de tecidos vegetais lesados foi realizada em co-cultura de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) com *A. tumefaciens* (Stachel & Zambryski, 1986a). Na mesma época, as primeiras moléculas-sinal (acetosiringona e hidroxacetosiringona) foram identificadas como potentes indutores dos genes *vir* (Stachel *et al.*, 1985). O pH extracelular ácido e a presença de açúcares (como glicose e galactose) e de aminoácidos foram também caracterizados como ativadores da região *vir* (Winans *et al.*, 1994). Desses estímulos, os compostos fenólicos são os mais importantes indutores da virulência da agrobactéria. O pH ácido (5,2 a 5,8) e açúcares não são capazes de estimular a indução na ausência de compostos fenólicos, mas são considerados fortes potenciais da indução. Estes indutores químicos são característicos de tecidos vegetais lesados: compostos fenólicos e açúcares são precursores de importantes componentes da parede celular como lignina e celulose e, como os vacúolos ocupam a maior parte do volume celular, e são geralmente ácidos, a seiva exsudada tende a ser ácida (Winans, 1992; Sheng & Citovsky, 1996).

As proteínas *VirA* e *VirG* pertencem a uma classe de proteínas conhecidas como sistema regulatório de dois componentes ("two-component regulatory system"). Em tal sistema, a proteína *VirA* funciona como uma proteína sensora, enquanto a proteína *VirG* age como um ativador transcricional por ligar-se a regiões promotoras dos operons *vir*, iniciando assim o processo de transferência da região-T (Hooykaas & Beijersbergen, 1994; Winans *et al.*, 1994).

A *VirA* é uma histidina quinase presente na membrana interna da bactéria. Dos estímulos químicos já mencionados, os açúcares ativam indiretamente *VirA* através da proteína periplasmática *ChvE*, que liga-se a açúcares. O complexo formado pela proteína *ChvE*-açúcar interage então com o domínio periplasmático de *VirA* (Cangelosi *et al.*, 1990). Por outro lado, os compostos fenólicos parecem interagir diretamente com *VirA* (Lee *et al.*, 1995). Na presença desses estímulos químicos, a proteína *VirA* autofosforila o resíduo de histidina 474, que é um resíduo específico e altamente conservado na família das quinases. O grupamento fosfato ligado a este resíduo pode ser então transferido diretamente para o resíduo específico de aspartato 52, altamente conservado na proteína *VirG*. Uma vez fosforilada, a proteína *VirG*, que localiza-se no citoplasma bacteriano, passa de sua forma inativa para sua forma ativa (Hooykaas & Beijersbergen, 1994; Winans *et al.*, 1994).

Para ativar a sua própria expressão e a dos demais operons *vir*, a proteína *VirG* ativada liga-se ao *vir box*, uma

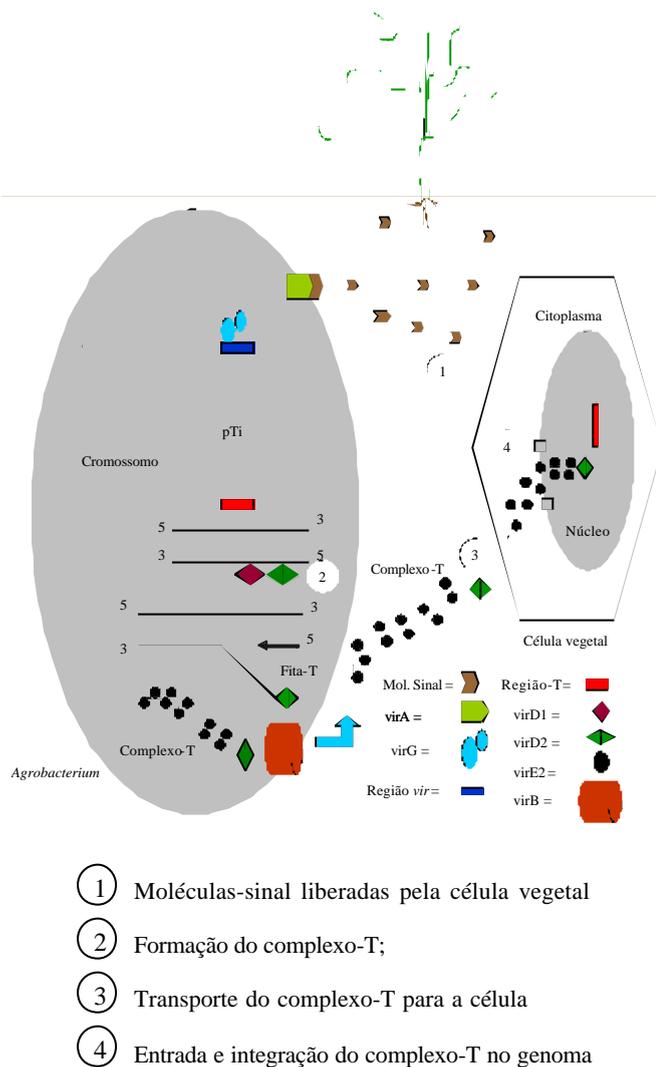


FIG. 2 - Representação esquemática do processo de transformação de uma célula vegetal por *Agrobacterium* spp. (Gelvin, 2000; Zupan *et al.*, 2000; Ziemienowicz, 2001).

seqüência específica e altamente conservada de 12 pb presente na região promotora de cada operon *vir* (Jinet *et al.*, 1990). Assim, a ligação com VirG é necessária para ativação dos operons da região *vir*, embora o real papel da fosforilação de VirG ainda não foi determinado, visto que a proteína VirG não-fosforilada também liga-se especificamente ao *vir box*. A fosforilação poderia aumentar a afinidade de ligação com o DNA e/ou permitir interações com outras proteínas importantes no processo transcricional, como a RNA polimerase (Winans *et al.*, 1994; Sheng & Citovsky, 1996).

Formação do complexo-T

Após a ativação da expressão dos operons *vir*, inicia-se o processo de transferência da região-T para a célula vegetal. Os operons *virD* e *virC* estão envolvidos nas primeiras etapas desse processo.

As proteínas VirD1 e VirD2, codificadas pelo operon *virD*, são essenciais para o reconhecimento e clivagem da região-T (Yanosfsky *et al.*, 1986). A proteína VirD1 apresenta alta afinidade pelas seqüências de 25 pb das extremidades da região-T e também possui atividade topoisomerase (Ghai & Das, 1989). Assim, VirD1 poderia reconhecer as extremidades da região-T e, ao mesmo tempo, converter o DNA para a forma relaxada, expondo as seqüências específicas de clivagem para a proteína VirD2, que tem uma atividade endonucleásica e também reconhece especificamente os 25 pb de cada extremidade da região-T (Yanosfsky *et al.*, 1986). A primeira clivagem por VirD2 ocorre na extremidade 5' direita, entre a terceira e quarta base da fita inferior (Wang *et al.*, 1987). Após a clivagem, a proteína VirD2 liga-se covalentemente a essa extremidade 5' direita clivada através do resíduo de tirosina 29 (Herrera-Estrella *et al.*, 1988; Pansegrau *et al.*, 1993). Uma segunda clivagem na extremidade 3' esquerda, leva à liberação da fita inferior da região-T, que continua associada à proteína VirD2 na extremidade 5' direita. Esta molécula de DNA linear, fita simples, obtida após o deslocamento da fita inferior da região-T, é denominada fita-T. Desta forma, o deslocamento da fita-T ocorre na direção 5' - 3' da fita inferior da região-T, iniciando na extremidade direita e terminando na extremidade esquerda, indicando a existência de polaridade no processamento da fita-T (Zambryski *et al.*, 1989).

Uma vez liberada a fita-T, uma cópia da fita inferior da região-T é sintetizada a partir da extremidade direita (direção 5' - 3'), utilizando a fita superior como molde. A síntese continua até atingir o sítio de clivagem da extremidade 3' esquerda. Embora as proteínas VirD1 e VirD2 estejam envolvidas diretamente no processo de clivagem, não existe nenhuma evidência experimental que indique que VirD1 permaneça associada à fita-T, como VirD2 (Binns *et al.*, 1992; Zambryski, 1992; Hooykaas & Beijersbergen, 1994; Sheng & Citovsky, 1996).

À medida que a fita inferior vai separando-se da fita superior da região-T, a proteína VirE2 liga-se covalentemente e de maneira não-específica à mesma (Gietl *et al.*, 1987). VirE2 é uma proteína codificada pelo operon *virE* que possui alta afinidade por fita simples de DNA, isto é, é uma proteína de ligação à fita simples de DNA ["single strand" DNA "binding (SSB) protein"] (Christie *et al.*, 1988). Esta ligação é extremamente forte e cooperativa, levando à formação de um complexo muito estável entre a fita-T e VirE2. A relativa abundância de VirE2 e sua alta afinidade por fita simples de DNA poderiam permitir sua rápida ligação à fita-T, durante sua formação, protegendo-a da degradação por nucleases, além de evitar o dobramento da mesma (Citovsky *et al.*, 1989). Um modelo foi então proposto, onde a ligação entre VirE2 e a fita-T resulta na formação de uma estrutura rígida e cilíndrica, semelhante a um fio de telefone (Citovsky *et al.*, 1997). A formação desta estrutura é especialmente importante para o transporte da fita-T através dos poros nucleares. Assim, embora, o operon *virE* não seja essencial para o processo de transferência da fita-T para a célula vegetal, ele é importante para a eficiência desse processo (Binns *et al.*, 1992).

As proteínas VirC1 e VirC2, codificadas pelo operon *virC*, ligam-se especificamente a uma seqüência conservada, localizada próxima à extremidade direita da região-T, denominada “overdrive” (ou região *ode*). A exata função das proteínas VirC não é conhecida. No entanto, acredita-se que o complexo formado entre VirC1-overdrive favorece a correta orientação das proteínas VirD1 e VirD2 para o reconhecimento dos sítios de clivagem, aumentando desta forma a eficiência no processo de clivagem e transferência da fita-T (Toro *et al.*, 1988, 1989). Várias outras enzimas, como helicases, polimerases e enzimas de reparo são também necessárias para a produção da fita-T e são codificadas, provavelmente, por genes do cromossomo bacteriano (Zambryski, 1992; Zhu *et al.*, 2000).

O mecanismo pelo qual a fita-T deixa a célula bacteriana, penetra na célula vegetal e integra-se no seu genoma nuclear, é pouco conhecido (Zupan *et al.*, 2002). Sabe-se que, para a fita-T chegar até o núcleo da planta, ela precisa atravessar membranas, paredes celulares e espaços inter e intracelulares. Acredita-se que a fita-T é transportada da bactéria para a célula vegetal, como um complexo nucleoprotéico, conhecido como complexo-T e formado pela fita-T protegida na extremidade 5' por VirD2 e envolvida por vários monômeros de VirE2 (Citovsky *et al.*, 1989).

Transporte intercelular do complexo-T

A primeira etapa do transporte intercelular do complexo-T consiste na sua passagem através da membrana da agrobactéria. Trabalhos iniciais demonstraram que o operon *virB* era necessário para a virulência, mas não para a etapa de formação da fita-T. A análise das seqüências de aminoácidos das proteínas VirB permitiu identificar algumas de suas características físicas, localização celular e possíveis funções (Zambryski, 1992; Zupan *et al.*, 2000). A maioria das 11 proteínas codificadas pelo operon *virB* exibe características de proteínas de membrana, como seqüências hidrofóbicas e/ou seqüências-sinal. Estudos posteriores confirmaram a localização de proteínas VirB na membrana interna e externa de *Agrobacterium* spp. (Thorstenson *et al.*, 1993). Assim, algumas das proteínas VirB poderiam formar uma estrutura funcionalmente similar a um canal, ou poro conjugal, necessária para o transporte do complexo-T (Ward *et al.*, 1988; Zupan *et al.*, 1998). Duas proteínas, VirB4 e VirB11, ambas associadas à membrana interna da bactéria, possuem atividade ATPase. Essas proteínas poderiam fornecer a energia necessária para o transporte do complexo-T através da membrana da agrobactéria (Berger & Christie, 1993).

As interações que ocorrem entre o complexo-T e as proteínas VirB são pouco conhecidas. Estudos de comparação de seqüências identificaram algumas das proteínas do operon *virB* semelhantes às proteínas envolvidas no processo de transferência conjugativa de plasmídios entre bactérias (Lessl & Lanka, 1994). Este processo requer um poro ou canal através do qual o DNA plasmidial atravessa a membrana da célula doadora e alcança a célula receptora (Winans *et al.*, 1996). Assim, supõe-se que a VirD4, uma proteína ancorada na membrana interna da agrobactéria, seria o produto que

intermediaria a ligação do complexo-T ao canal VirB, auxiliando na translocação entre a bactéria e a célula hospedeira (Okamoto *et al.*, 1991; Lessl & Lanka, 1994).

Estudos recentes indicam que a proteína VirE1 parece funcionar como uma chaperona e é necessária para o transporte da proteína VirE2 para fora da célula bacteriana (Sundberg *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1999). Estudos recentes sugerem que a proteína VirE2 é exportada para fora da célula bacteriana separadamente do complexo fita-T:VirD2 e a formação do complexo-T só seria completada dentro do citoplasma da célula vegetal (Zupan *et al.*, 2000). Entretanto, estudos adicionais serão necessários para confirmar esta hipótese.

Transporte intracelular do complexo-T

O aparato VirB libera o complexo-T dentro do citoplasma da célula vegetal. Entretanto, outras etapas são necessárias para o transporte do complexo-T até o nucleoplasma e sua integração no genoma nuclear. Provavelmente, existam receptores na membrana celular vegetal que possam estar auxiliando a entrada do complexo-T no citoplasma da célula vegetal. Entretanto, o mecanismo que possibilita a entrada do complexo-T no núcleo da célula da planta é pouco caracterizado. A possibilidade do complexo-T entrar por difusão passiva no núcleo da planta foi excluída, pois o tamanho limite estimado para o mesmo, aproximadamente 50 kDa, excede o tamanho do poro nuclear. Além disso, a entrada de moléculas no núcleo da célula é um processo extremamente seletivo, que requer a ativação de proteínas presentes no poro nuclear, sugerindo desta forma, que o transporte do complexo-T seja feito de forma ativa (Citovsky & Zambryski, 1993). Esta ativação é mediada por uma seqüência-sinal de localização nuclear (NLS) presente na própria molécula a ser transportada ou em moléculas associadas a ela. Como a fita-T não possui seus próprios sinais de direcionamento, sua importação para o núcleo da célula vegetal é provavelmente mediada pelas proteínas da agrobactéria que a acompanham em sua odisséia, i.e., as proteínas VirD2 e VirE2. A proteína VirD2 contém uma seqüência homóloga ao tipo bipartido de NLS, previamente descrita em outras proteínas, e que é funcionalmente ativa em animais e plantas (Tinland *et al.*, 1992). Todavia, a eliminação de alguns aminoácidos da seqüência NLS de VirD2 em linhagens de *Agrobacterium* spp. reduziu, mas não aboliu, a capacidade de induzir tumores em plantas.

A proteína VirE2 tem também um papel importante no transporte nuclear do complexo-T, pois a virulência de linhagens de *Agrobacterium* spp. com VirE2 inativada foi restaurada após inoculação em plantas transgênicas expressando a proteína VirE2 (Ward & Zambryski, 2001). VirE2 possui duas seqüências NLS, ambas requeridas para um eficiente transporte do complexo-T para o núcleo da célula (Lartey & Citovsky, 1997). Trabalhos sugeriram que VirE2 poderia ser capaz de, sozinha, mediar o transporte do complexo-T para dentro do núcleo da célula da planta (Zambryski, 1992). Esta hipótese está baseada no fato de VirE2 fornecer várias seqüências NLS ao longo de todo o complexo-T (aproximadamente 600 monômeros), facilitando dessa maneira uma importação ininterrupta do

complexo-T para o núcleo da célula. Além disso, fita simples de DNA (ssDNA) fluorescente foi localizada no núcleo da célula vegetal apenas quando microinjetada como um complexo com a proteína VirE2 (ssDNA-VirE2) (Zupan *et al.*, 1996). Quando o DNA foi microinjetado sozinho (ssDNA), o mesmo permaneceu no citoplasma. Assim, o modelo proposto para o transporte do complexo-T pela membrana nuclear sugere que VirD2 poderia orientar e iniciar a entrada do complexo-T no poro, enquanto os vários monômeros de VirE2 dirigiriam sua passagem pelo poro nuclear (Lartey & Citovsky, 1997; Tzfira *et al.*, 2001; Ziemienowicz *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2002).

Enquanto muitas das proteínas de *Agrobacterium* spp. envolvidas no processo de transporte do complexo-T já foram caracterizadas, pouco é conhecido sobre os fatores celulares vegetais que participam deste processo. Foi constatado que a proteína VirD2 interage *in vivo* e *in vitro* com uma proteína de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynhold denominada AtKAP α , a qual pertence à família das carioferinas α (Ballas & Citovsky, 1997). Este receptor medeia, provavelmente, a importação do complexo-T para o núcleo, mediante interação com a seqüência NLS presente na proteína VirD2. Diferentemente da VirD2, a proteína VirE2 não interage com o receptor AtKAP α , sugerindo que outro receptor deva interagir com esta proteína. Foi também constatado que a proteína VirD2 interage *in vivo* e *in vitro* com três proteínas de *A. thaliana* pertencentes à família das ciclofilinas, que são altamente conservadas em plantas, animais e procariotos (Deng *et al.*, 1998). Embora a função biológica das ciclofilinas não esteja clara na infecção por *Agrobacterium* spp., elas são conhecidas por atuar como chaperonas, que poderiam preservar a conformação da proteína VirD2 quando no citoplasma da célula hospedeira ou durante a importação e/ou integração da fita-T no genoma da planta (Deng *et al.*, 1998).

Integração da fita-T no genoma da planta

A etapa final do processo de transferência do complexo-T consiste na sua integração no genoma nuclear da célula hospedeira. Todavia, os mecanismos moleculares envolvidos nesta etapa são ainda pouco conhecidos. Ao contrário de outros elementos móveis, como transposons, o T-DNA não codifica nenhuma proteína envolvida na sua própria integração. Assim, a integração da fita-T no genoma vegetal pode ser mediada pelas proteínas VirD2 e VirE2, em combinação com proteínas da própria célula hospedeira (Tinland, 1996; Tzfira *et al.*, 2000).

Mutações realizadas na proteína VirD2 provocaram alterações no padrão de integração da extremidade 5' do T-DNA no genoma da célula hospedeira. Embora estas mutações tenham reduzido a eficiência de transferência do complexo-T, as mesmas não afetaram a eficiência da integração da fita-T no genoma da célula vegetal (Tinland *et al.*, 1995). Estes resultados sugerem que a proteína VirD2 participa da ligação da extremidade 5' da fita-T no DNA da planta, mas esta ligação não é um fator limitante para o processo de integração. Além da VirD2, a proteína VirE2 pode também estar envolvida no processo de integração da fita-T. Esta proteína, além de proteger

fisicamente a fita-T da ação de nucleases vegetais, pode ser requerida para a integração da sua extremidade 3' com o DNA da planta (Ward & Zambryski, 2001).

Os poucos dados existentes na literatura não permitem tirar conclusões definitivas sobre o padrão de integração da fita-T no cromossomo de plantas transformadas por *Agrobacterium* spp. Todavia, dados obtidos com diferentes espécies vegetais indicam que os sítios de integração são randômicos, isto é, não existe uma preferência por determinado cromossomo ou por regiões específicas dentro do cromossomo. Entretanto, algumas evidências sugerem que a fita-T integra-se preferencialmente em regiões do cromossomo que são transcricionalmente ativas (Tinland & Hohn, 1995).

Os sítios de ligação da fita-T com o DNA de plantas transgênicas de *A. thaliana* foram seqüenciados e analisados, permitindo tirar algumas conclusões: (i) a integração da fita-T não é sítio-específica e não requer longos trechos de homologia; (ii) a integração da fita-T leva a pequenas deleções do DNA da planta no sítio de inserção (menos que 100 bp); (iii) a parte 3' esquerda do T-DNA é pouco conservada e também possui uma curta região de homologia com o sítio de pré-inserção (pelo menos cinco nucleotídeos contíguos); (iv) a parte 5' direita do T-DNA é frequentemente conservada até o nucleotídeo que é clivado na bactéria (Gheysen *et al.*, 1991). Em alguns casos, a homologia com o sítio de pré-inserção está restrita a uma ou poucas bases (microhomologia). Outra observação interessante é que, uma vez dentro do núcleo, a fita-T torna-se fita dupla com o concomitante deslocamento de VirE2, antes da sua integração.

A partir destas e outras observações, alguns modelos para integração da fita-T no genoma da planta foram propostos. O primeiro deles sugere que a integração de cada uma das extremidades da fita-T no DNA da planta ocorra por recombinação ilegítima (Gheysen *et al.*, 1991). Neste modelo, a ligação da extremidade 5' direita da fita-T ao DNA da planta ocorre primeiro, seguida da ligação da extremidade 3' esquerda. Outro modelo propõe que a integração da fita-T inicia-se pela extremidade 3' da fita-T através do anelamento de seqüências de 2 a 5 pb (microhomologia) expostas à seqüência complementar do DNA da planta (Tinland *et al.*, 1995; Mysore *et al.*, 1998). Outra hipótese é que a ligação com a fita-T (na forma fita dupla) ocorreria através do reparo das pontas de uma quebra da fita dupla do DNA da planta (Zupan *et al.*, 2000). Esta hipótese é bastante consistente com vários arranjos observados como resultado da integração da fita-T. Em qualquer dos casos, a integração das extremidades 5' e 3' parece ser auxiliada pela maquinaria da planta. Recentemente, o primeiro fator da planta (histona H2) envolvido na integração da fita-T foi identificado, confirmando o envolvimento de proteínas estruturais vegetais neste processo (Mysore *et al.*, 2000). Desta forma, a replicação do DNA e a atuação das enzimas de reparo da planta são importantes para auxiliar na integração da fita-T no genoma vegetal.

Outros genes da região *vir*

Alguns genes do regulon *vir* não são essenciais para a

tumorigênese em todos os hospedeiros e alguns são necessários somente em hospedeiros específicos ou têm uma função auxiliar na transferência da região-T. Esses genes incluem *virD3*; -D5; -E3; -F; -H; -J; -K; -L; -M; -P e -R (Kalogeraki *et al.*, 2000; Nester, 2000; Zhu *et al.*, 2000). *VirF* é uma proteína encontrada em algumas linhagens de *Agrobacterium* spp. e parece estar envolvida com espectro de hospedeiro. Assim como as proteínas *VirD2* e *VirE2*, a proteína *VirF* penetra na célula hospedeira, onde, por um mecanismo ainda pouco conhecido, altera o espectro de hospedeiro da linhagem indutora. O operon *virH* possui dois genes que, por análise de seqüência, parecem codificar monooxigenases do tipo P450. Mutações em ambos os genes tiveram um efeito mínimo na virulência. Estudos com a proteína *VirD3* concluíram também que a mesma não é necessária para a transformação da célula vegetal.

SEMELHANÇAS COM A CONJUGAÇÃO BACTERIANA

Várias evidências suportam a hipótese de uma relação evolucionária comum entre a transferência de DNA para plantas mediada por *Agrobacterium* spp. e a transferência conjugativa de plasmídios entre bactérias. Esta hipótese foi proposta pela primeira vez após a descoberta da fita-T (Stachel & Zambryski, 1986b). Neste trabalho, os autores compararam os dois sistemas de transferência de DNA, sugerindo analogias funcionais entre *oriT* (origem de transferência conjugativa) e as extremidades da região-T, e os genes *tra* (requeridos para o processo de reconhecimento e transferência do plasmídio) e a região *vir*. Desde então, análises detalhadas do processo de transferência conjugativa têm fornecido evidências que confirmam essa analogia entre os dois sistemas. Entre os processos comuns estão o contato célula-célula, o início da transferência do DNA e o seu transporte através das membranas. Essas semelhanças incluem proteínas com seqüências de aminoácidos similares e/ou com equivalência de funções, organização gênica e propriedades físicas das enzimas envolvidas (Lessl & Lanka, 1994; Zupan & Zambryski, 1995; Moriguchi *et al.*, 2001). Como exemplo, evidências sugerem forte correlação entre as proteínas *VirD1/VirD2* do plasmídio Ti e as proteínas *TraI/TraJ* envolvidas na conjugação bacteriana (Pansegrau *et al.*, 1993). Em ambos os sistemas, similaridades funcionais têm sido observadas, como clivagem sítio-específica e ligação covalente da proteína à extremidade 5' após a clivagem.

EXPRESSÃO DOS GENES DO T-DNA NA CÉLULA VEGETAL

Uma vez inseridos no genoma da planta, os genes presentes na região-T, agora denominada T-DNA, passam a ser transcritos e traduzidos, dando início ao desenvolvimento do tumor. Todos os genes do T-DNA, apesar de sua origem procariota, possuem sinais de regulação que são reconhecidos pela maquinaria de transcrição eucariota vegetal, incluindo TATA e CAAT "boxes", "enhancers" transcripcionais e cauda

poli(A). Assim, os genes do T-DNA são expressos ao mesmo tempo e da mesma maneira que os genes da planta. O estudo da expressão dos genes do T-DNA identificou diversos transcritos presentes no tumor, codificando proteínas cujas funções foram sendo aos poucos elucidadas. Entre os genes estudados, distinguem-se, de um lado, os genes responsáveis pelas propriedades tumorais (ou oncogenes) e os genes responsáveis pela síntese de opinas.

Os oncogenes

Os oncogenes (*iaaM*, *iaaH*, *ipt*, *5* e *6b*), presentes na região-T do plasmídio Ti de *A. tumefaciens*, estão diretamente envolvidos na formação da galha durante o processo de infecção pela bactéria (Schröder *et al.*, 1984). Os genes *iaaM* e *iaaH*, presentes no locus *tms* ("tumour morphology shooty"), codificam enzimas que estabelecem uma via alternativa de biossíntese de auxinas (ácido indolacético, AIA) nas células transformadas (Schröder *et al.*, 1984; Thomashow *et al.*, 1986). Por outro lado, o gene *ipt*, presente no locus *tmr*, codifica uma isopentenil-transferase que catalisa a primeira etapa de biossíntese de precursores de citocinina (Barry *et al.*, 1984). A expressão desses três oncogenes causa um desequilíbrio hormonal nas células transformadas, levando à sua multiplicação descontrolada, e resultando na formação dos tumores. Por isso, quando isolados da planta e cultivados em meio de cultura sem reguladores de crescimento, esses tumores são capazes de crescer indefinidamente devido à sua produção endógena de hormônios vegetais (Hooykaas & Schilperoort, 1992).

Além dos genes *iaaM*, *iaaH* e *ipt*, que são diretamente responsáveis pelo desenvolvimento do tumor, a região-T possui outros oncogenes (genes *5* e *6b*) envolvidos em uma fina regulação do balanço de auxina/citocinina no tumor, tendo em vista que a presença de altos níveis desses hormônios de crescimento podem levar à morte celular. Ensaios realizados *in vitro* sugerem que o gene *5*, na presença de altas concentrações de auxina, codifica uma indole-3-lactate que converte o triptofano em ácido indol-láctico (ILA). Desta forma, o ILA, que é um análogo de auxina, compete pela ligação com proteínas envolvidas na transdução de sinal de auxinas, reduzindo os níveis desse hormônio no tumor (Körber *et al.*, 1991). Por outro lado, o gene *6b* (também conhecido como *tml*) aumenta a sensibilidade das células vegetais aos hormônios da planta, por um mecanismo ainda desconhecido (Spanier *et al.*, 1989; Tinland *et al.*, 1989, 1990).

O fenótipo final do tumor depende, assim, da proporção de auxinas e citocininas sintetizadas pelas células transformadas e dos níveis endógenos desses reguladores no sítio de infecção (Steffen *et al.*, 1986; Stafford, 2000). Como consequência deste desbalanço hormonal, as células transformadas proliferam desordenadamente, levando à formação de um tumor, conhecido como galha-da-coroa. Em *A. rhizogenes*, a expressão dos oncogenes induz a produção de raízes no local do ferimento, devido, provavelmente, a um aumento da sensibilidade à auxina nas células transformadas. O sintoma então observado é conhecido como raiz em cabeleira (Meyer *et al.*, 2000).

Os genes de síntese de opinas

Outros genes presentes no T-DNA codificam enzimas envolvidas na via da biosíntese de opinas, que são compostos formados pela condensação de aminoácidos ou carboidratos modificados (Dessaux *et al.*, 1993). As opinas produzidas nos tumores pelas células transformadas são secretadas para as regiões intercelulares do tumor e metabolizadas especificamente pela linhagem de *Agrobacterium* sp. indutora do tumor (Ellis *et al.*, 1979). Desta forma, as linhagens patogênicas de *Agrobacterium* spp. podem ser classificadas de acordo com o tipo de opina sintetizada pelo seu T-DNA, como por exemplo: octopina, nopalina, agropina, cucumopina, manopina, etc. (Brasileiro & Lacorte, 1998). Existem, descritos na literatura, pelo menos 20 tipos diferentes de opinas e cada linhagem de *Agrobacterium* sp. sintetiza e catalisa um grupo específico de opinas (Chilton *et al.*, 2001). As opinas não são metabolizadas pelas células da planta, mas servem como principal fonte de carbono e nitrogênio para a agrobactéria infetante. O catabolismo destas opinas requer enzimas específicas. Como estas enzimas só são codificadas pelo plasmídeo Ti da agrobactéria indutora do tumor, nenhum outro microrganismo do solo pode catabolisá-las, criando assim um nicho biológico favorável para o crescimento desta bactéria (Binns *et al.*, 1992; Hooykaas & Beijersbergen, 1994).

Essa pressão seletiva favorece a multiplicação da linhagem indutora da galha que, por sua vez, irá reinfetar as células vegetais que ainda não foram transformadas. Além disto, as opinas estimulam a transferência conjutiva do plasmídeo Ti para linhagens não-patogênicas (sem plasmídeo Ti) de *A. radiobactere*, conseqüentemente, são responsáveis pelo aumento de população bacteriana capaz de utilizar essas opinas como fonte de nutrientes. Assim, a síntese de opinas pelas células vegetais infetadas e seu catabolismo pela bactéria indutora da galha tiveram provavelmente um papel muito importante na disseminação do plasmídeo Ti na natureza. A teoria que propõe a atuação das opinas como intermediárias químicas do parasitismo (ou colonização genética), é conhecida como o "conceito de opinas" (Guyon *et al.*, 1980; Dessaux *et al.*, 1993).

Outros genes do T-DNA

Até hoje, nenhuma função pode ser atribuída com certeza à parte esquerda do T-DNA das linhagens do tipo nopalina (transcritos *a, b, c, d e e*) ou aos transcritos 7, 3' e 4' das linhagens do tipo octopina. De qualquer maneira, sabe-se que esses genes podem ser deletados do T-DNA, sem que isso modifique visivelmente o fenótipo do tumor.

CONCLUSÃO

O conhecimento das bases moleculares do mecanismo de infecção por *Agrobacterium* spp. contribuiu enormemente para um melhor entendimento das relações patógeno-hospedeiro, assim como permitiu avanços consideráveis em outras áreas da pesquisa como virologia, transporte inter- e intracelular, sistemas de secreção de moléculas, conjugação

bacteriana, entre outros. Por outro lado, o desenvolvimento de técnicas em biologia celular e molecular vegetal abriu novas perspectivas para as pesquisas sobre a transferência de genes exógenos para plantas, utilizando *Agrobacterium* spp. como vetor natural de transformação. A transferência de genes de origens distintas para diferentes espécies vegetais foi possível graças ao desenvolvimento de vetores derivados do plasmídeo Ti e sua introdução em linhagens desarmadas de *Agrobacterium* spp., onde os oncogenes foram eliminados. A alta eficiência de transformação, o baixo custo operacional, assim como a simplicidade dos protocolos de transformação, são as maiores razões para a universalidade do uso do sistema *Agrobacterium* spp.

Atualmente, diferentes características de interesse sócio-econômico já foram introduzidas em diferentes espécies vegetais por transformação genética através do sistema *Agrobacterium* spp. Essas características visam principalmente o melhoramento do desempenho em campo das plantas cultivadas, através da resistência a estresses bióticos e abióticos. Características relacionadas ao desenvolvimento da planta e à qualidade do produto também podem ser modificadas em plantas transgênicas. A tendência é que cada vez um maior número de características possa ser manipulado via engenharia genética, aumentando a gama de produtos a serem disponibilizados para o agricultor e o consumidor. Em um futuro breve, as plantas transgênicas desempenharão também o papel de biofábricas, desenvolvidas para a produção de produtos de interesse para as indústrias de medicamentos, de alimentos ou de rações.

Além de todas as implicações para a agricultura e outros setores da economia, as plantas transgênicas constituem também um excelente sistema para estudos básicos em diferentes campos da biologia, como fisiologia, genética, botânica, biologia molecular e celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALNOR, D., FRIMODT-MØLLER, N., ESPERSEN, F. & FREDERIKSEN, W. Infections with unusual human pathogens *Agrobacterium* species and *Ochrobactrum anthropi*. *Clinical Infections Diseases* 18:914-920. 1994.
- BALLAS, N. & CITOVSKEY, V. Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. *Cell Biology* 94:10723-10728. 1997.
- BARRY, G.F., ROGERS, S.G., FRALEY, R.T. & BRAND, L. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings National Academy of Science USA* 81:4776-4780. 1984.
- BERGER, B.R. & CHRISTIE, P.J. The *Agrobacterium tumefaciens* virB4 gene product is an essential virulence protein requiring an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *Journal of Bacteriology* 175:1723-1734. 1993.
- BERIAM, L.O.S., MALAVOLTA JR., V.A. & ROBBS, C.F. Considerações sobre o gênero *Agrobacterium*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4:51-74. 1996.
- BINNS, A.N., JOERGER, R.D. & WARD, J.E. *Agrobacterium* and plant cell transformation. In: Lederberg, J. (Ed.) *Encyclopedia of*

- MICROBIOLOGY. San Diego, USA. Academic Press, Inc. 1992. pp.37-51.
- BRASILEIRO, A.C.M. & LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. In: Brasileiro, A.C.M. & Carneiro, V.T.C. (Eds.) Manual de transformação genética de plantas. Brasília, Brasil. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen. 1998. pp.75-92.
- CANGELOSI, G.A., ANKENBAUER, R.G. & NESTER, E.W. Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. Proceedings of National Academy Science USA 87:6708-6712. 1990.
- CHILTON, W.S., PETIT, A., CHILTON, M.D. & DESSAUX, Y. Structure and characterization of the crown gall opines heliopine, vitopine and rideopine. Phytochemistry 58:137-142. 2001.
- CHRISTIE, P.J., WARD, J.E., WINANS, S.C. & NESTER, E.W. The *Agrobacterium tumefaciens* virE2 gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associates with T-DNA. Journal of Bacteriology 170:2659-2667. 1988.
- CITOVSKY, V. & ZAMBRYSKI, P. Transport of nucleic acids through membrane channels: snaking through small holes. Annual Reviews Microbiology 47:167-197. 1993.
- CITOVSKY, V., WONG, M.L. & ZAMBRYSKI, P. Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA: Implications for the T-DNA transfer process. Biochemistry 86:1193-1197. 1989.
- CITOVSKY, V., GURALNICK, B., SIMON, M.N. & WALL, J.S. The molecular structure of *Agrobacterium* virE2-single stranded DNA complexes involved in nuclear import. Journal Molecular Biology 271:718-727. 1997.
- CONN, H.J. Validity of the genus *Alcaligenes*. Journal of Bacteriology 44: 353-360. 1942.
- DE CLEENE, M. & DE LEY, J. The host range of crown gall. Botanical Review 42:389-464. 1976.
- DENG, W.Y., CHEN, L.S., WOOD, D.W., METCALFE, T., LIANG, X.Y., GORDON, M.P., COMAI, L. & NESTER, E.W. *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. Proceedings of National Academy Science USA 95:7040-7045. 1998.
- DENG, W.Y., CHEN, L.S., PENG, W.T., LIANG, X.Y., SEKIGUCHI, S., GORDON, M.P., COMAI, L. & NESTER, E.W. VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded-DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. Molecular Microbiology 31:1795-1807. 1999.
- DESSAUX, Y., PETIT, A. & TEMPÉ, J. Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. Phytochemistry 34:31-38. 1993.
- DUNNE, W.M.JR., TILLMAN, J. & MURRAY, J.C. Recovery of a strain of *Agrobacterium radiobacter* with a mucoid phenotype from an immunocompromised child with bacteremia. Journal of Clinical Microbiology 31:2541-2543. 1993.
- ELLIS, J.G., KERR, A., VAN MONTAGU, M. & SCHELL, J. *Agrobacterium* genetic studies on agrocin 84 production and the biological control of crown gall. Physiology Plant Pathology 15:311-319. 1979.
- GELVIN, S.B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology 51:223-256. 2000.
- GHAJ, J. & DAS, A. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. Proceedings of National Academy Science USA 86:3109-3113. 1989.
- GHEYSEN, G., VILLARROEL, R. & VAN MONTAGU, M. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. Genes Development 5:287-297. 1991.
- GIETL, C., KOUKOLIKOVA-NICOLA, Z. & HOHN, B. Mobilization of T-DNA from *Agrobacterium* to plant cells involves a protein that binds single-stranded DNA. Proceedings of National Academy Science USA 84:9006-9010. 1987.
- GUYON, P., CHILTON, M.D., PETIT, A. & TEMPÉ, J. Agropine in "null-type" crown gall tumors: evidence for generality of the opine concept. Proceedings of National Academy Science USA 77:2693-2697. 1980.
- HAMILTON, R.H. & FALL, M.Z. The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. Experientia 27:229-230. 1971.
- HERRERA-ESTRELLA, L., TEERI, T.H. & SIMPSON, J. Use of reporter genes to study gene expression in plant cells. In: Gelvin, S.B. & Schilperoort, R.A. (Eds.) Plant Molecular Biology Manual. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 1988. pp.B1:1-22.
- HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T. & WILLIAMS, S.T. Bergey's manual of determinative bacteriology. In: Baltimore. Williams & Wilkins. 1994.
- HOOYKAAS, P.J.J. & SCHILPEROORT, R.A. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Molecular Biology 19:15-38. 1992.
- HOOYKAAS, P.J.J. & BEIJERSBERGEN, A.G.M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. Annual Reviews Phytopathology 32:157-179. 1994.
- JIN, S.G., ROITSCH, T., CHRISTIE, P.J. & NESTER, E.W. The regulatory VirG protein specifically binds to a cis-acting regulatory sequence involved in transcriptional activation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. Journal of Bacteriology 172:531-537. 1990.
- KALOGERAKI, V.S., ZHU, J., STRYKER, J.L. & WINANS, S.C. The right end of the vir region of an octopine-type Ti plasmid contains four new members of the vir regulon that are not essential for pathogenesis. Journal of Bacteriology 182:1774-1778. 2000.
- KERSTERS, K. & DE LEY, J. Genus III. *Agrobacterium* Conn 1942. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (Ed.) Bergey's manual of systemic bacteriology. Baltimore. Williams & Wilkins. 1984. pp.244-254.
- KÖRBER, H., STRIZHOV, N., STAIGER, D., FELDWISCH, J., OLSSON, O., SANDBERG, G., PALME, K., SCHELL, J. & KONCZ, C. T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants. The EMBO Journal 10:3983-3991. 1991.
- LARTEY, R. & CITOVSKY, V. Nucleic acid transport in plant-pathogen interactions. Genetic Engineering 19:201-214. 1997.
- LEE, H.S., KIM, S.W., LEE, K.W., ERIKSSON, T. & LIU, J.R. *Agrobacterium*-mediated transformation of ginseng (*Panax ginseng*) and mitotic stability of the inserted beta-glucuronidase gene in regenerants from isolated protoplasts. Plant Cell Reports 14:545-549. 1995.
- LESSL, M. & LANKA, E. Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. Cell 77:321-324. 1994.
- LIPPINCOTT, J.A., LIPPINCOTT, B.B. & STARR, M.P. The genus *Agrobacterium*. In: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. & Schlegel, H.G. (Eds.) The prokaryotes: a handbook on habitats,

- isolation, and identification of bacteria. Berlin. Springer-Verlag. 1981. pp.842-855.
- MATTHYSSE, A.G. & MCMAHAN, S. Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in cel, attB, attD, and attR mutants. *Applied Environment Microbiology* 64:2341-2345. 1998.
- MATTHYSSE, A.G., YARNALL, H., BOLES, S.B. & MCMAHAN, S. A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1490:208-212. 2000.
- MEYER, A.D., TEMPÉ, J. & COSTANTINO, P. Hairy root: A molecular overview functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5:93-139. 2000.
- MORIGUCHI, K., MAEDA, Y., SATOU, M., HARDAYANI, N.S., KATAOKA, M., TANAKA, N. & YOSHIDA, K. The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *Journal of Molecular Biology* 307:771-784. 2001.
- MYSORE, K.S., NAM, J. & GELVIN, S.B. An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:948-953. 2000.
- MYSORE, K.S., BASSUNER, B., DENG, X.B., DARBINIAN, N.S., MOTCHOULSKI, A., REAM, W. & GELVIN, S.B. Role of the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein in T-DNA transfer and integration. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:668-683. 1998.
- NESTER, E.W. DNA and protein transfer from bacteria to eukaryotes - the *Agrobacterium* story. *Molecular Plant Pathology* 1:87-90. 2000.
- OKAMOTO, S., TOYODA-YAMAMOTO, A., ITO, K., TAKEBE, I. & MACHIDA, Y. Localization and orientation of the VirD4 protein of *Agrobacterium tumefaciens* in the cell membrane. *Molecular and General Genetics* 228:24-32. 1991.
- OPHEL, K. & KERR, A. *Agrobacterium vitis* sp. nov. for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40:236-241. 1990.
- PANSEGRAU, W., SCHOUMACHER, F., HOHN, B. & LANKA, E. Site-specific cleavage and joining of single-stranded DNA by VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmids: Analogy to bacterial conjugation. *Biochemistry* 90:11538-11542. 1993.
- ROMEIRO, R.S. Bactérias fitopatogênicas. Imprensa Universitária. Viçosa. 1995.
- SCHRÖDER, G., WAFFENSCHMIDT, S., WEILER, E.W. & SCHRÖDER, J. The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. *European Journal Biochemistry* 138:387-391. 1984.
- SHENG, J. & CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant Cell* 8:1699-1710. 1996.
- SIEMENS, J. & SCHIEDER, O. Transgenic plants: genetic transformation - recent developments and the state of art. *Plant Tissue Culture Biotechnology* 2:66-75. 1996.
- SMITH, E.F. & TOWNSEND, C.O. A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25:671-673. 1907.
- SOUTHERN JR., P.M. Bacteremia due to *Agrobacterium tumefaciens* (*radiobacter*): Report of infection in a pregnant woman and her stillborn fetus. *Diagnostic Microbiology and Infections Disease* 24:43-45. 1996.
- SPANIER, K., SCHELL, J. & SCHREIER, P.H. A functional analysis of T-DNA gene *6b* : the fine tuning of cytokinin effects on shoot development. *Molecular and General Genetics* 219:209-216. 1989.
- STACHEL, S.E. & NESTER, E.W. The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *The EMBO Journal* 5:1445-1454. 1986.
- STACHEL, S.E. & ZAMBRYSKI, P.C. *virA* and *virG* control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell* 46:325-333. 1986a.
- STACHEL, S.E. & ZAMBRYSKI, P.C. *Agrobacterium tumefaciens* and the susceptible plant cell: a novel adaptation of extracellular recognition and DNA conjugation. *Cell* 47:155-157. 1986b.
- STACHEL, S.E., MESSENS, E., VAN MONTAGU, M. & ZAMBRYSKI, P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318:624-629. 1985.
- STAFFORD, H.A. Crown gall disease and *Agrobacterium tumefaciens*: a study of the history, present knowledge, missing information, and impact on molecular genetics. *The Botanical Review* 66:99-118. 2000.
- STEFFEN, A., ERIKSSON, T. & SCHIEDER, O. Shoot regeneration of mesophyll protoplasts transformed by *Agrobacterium tumefaciens*, not achievable with untransformed protoplasts. *Theoretical and Applied Genetics* 72:135-140. 1986.
- SUNDBERG, C., MEEK, L., CARROLL, K., DAS, A. & REAM, W. VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *Journal of Bacteriology* 178:1207-1212. 1996.
- SUZUKI, K., HATTORI, Y., URAJI, M., OHTA, N., IWATA, K., MURATA, K., KATO, A. & YOSHIDA, K. Complete nucleotide sequence of a plant tumor-inducing Ti plasmid. *Gene* 242:331-336. 2000.
- THOMASHOW, M.F., HUGLY, S., BUCHHOLZ, W.G. & THOMASHOW, L.S. Molecular basis for the auxin-independent phenotype of crown gall tumor tissues. *Science* 231:616-618. 1986.
- THORSTENSON, Y.R., KULDAU, G.A. & ZAMBRYSKI, P.C. Subcellular localization of seven VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*: implications for the formation of a T-DNA transport structure. *Journal of Bacteriology* 175:5233-5241. 1993.
- TINLAND, B. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Science* 1:178-184. 1996.
- TINLAND, B. & HOHN, B. Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. In: Setlow, J.K. (Ed.) *Genetic Engineering*. New York. Plenum Press. 1995. pp.209-229.
- TINLAND, B., ROHFRIETSCH, O., MICHLER, P. & OTTEN, L. *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene *6b* stimulates *rol*-induced root formation, permits growth at high auxin concentrations and increases root size. *Molecular and General Genetics* 223:1-10. 1990.
- TINLAND, B., KOUKOLÍKOVÁ-NICOLA, Z., HALL, M.N. & HOHN, B. The T-DNA-linked VirD2 protein contains two distinct functional nuclear localization signals. *Cell Biology* 89:7442-7446. 1992.
- TINLAND, B., HUSS, B., PAULUS, F., BONNARD, G. & OTTEN, L. *Agrobacterium tumefaciens* *6b* genes are strain-specific and affect the activity of auxin as well as cytokinin genes. *Molecular and General Genetics* 219:217-224. 1989.
- TINLAND, B., SCHOUMACHER, F., GLOECKLER, V., BRAVO-

- ANGEL, A.M. & HOHN, B. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *The EMBO Journal* 14:3585-3595. 1995.
- TORO, N., DATTA, A., YANOFSKY, M. & NESTER, E.W. Role of the overdrive sequence in T-DNA border cleavage in *Agrobacterium*. *Proceedings of National Academy Science USA* 85:8558-8562. 1988.
- TORO, N., DATTA, A., CARMÍ, O.A., YOUNG, C., PRUSTI, R.K. & NESTER, E.W. The *Agrobacterium tumefaciens* virC1 gene product binds to overdrive, a T-DNA transfer enhancer. *Journal of Bacteriology* 171:6845-6849. 1989.
- TZFIRA, T. & CITOVSKEY, V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology* 1:201-212. 2000.
- TZFIRA, T., VAIDYA, M. & CITOVSKEY, V. VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. *The EMBO Journal* 20:3596-3607. 2001.
- TZFIRA, T., RHEE, Y., CHEN, M.H., KUNIK, T. & CITOVSKEY, V. Nucleic acid transport in plant-microbe interactions: the molecules that walk through the walls. *Annual Reviews Microbiology* 54:187-219. 2000.
- VAN LAREBEKE, N., ENGLER, G., HOLSTERS, M., VAN DEN ELSACKER, S., ZAENEN, I., SCHILPEROORT, R.A. & SCHELL, J. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252:169-170. 1974.
- WANG, K., STACHEL, S.E., TIMMERMAN, B., VAN MONTAGU, M. & ZAMBRYSKI, P.C. Site-specific nick in the T-DNA border sequence as a result of *Agrobacterium vir* gene expression. *Science* 235:587-591. 1987.
- WARD, D.V. & ZAMBRYSKI, P.C. The six functions of *Agrobacterium* VirE2. *Proceedings of National Academy Science USA* 98:385-386. 2001.
- WARD, D.V., ZUPAN, J.R. & ZAMBRYSKI, P.C. *Agrobacterium* VirE2 gets the VIP1 treatment in plant nuclear import. *Trends Plant Science* 7:1-3. 2002.
- WARD, J.E., AKIYOSHI, D.E., REGIER, D., DATTA, A., GORDON, M.P. & NESTER, E.W. Characterization of the virB operon from an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Journal of Biological Chemistry* 263:5804-5814. 1988.
- WATSON, B., CURRIER, T.C., GORDON, M.P., CHILTON, M.D. & NESTER, E.W. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* 123:255-264. 1975.
- WHITE, P.R. & BRAUN, A.C. Crown-gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science* 94:239-241. 1941.
- WINANS, S.C. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiological Reviews* 56:12-31. 1992.
- WINANS, S.C., BURNS, D.L. & CHRISTIE, P.J. Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends in Microbiology* 4:64-68. 1996.
- WINANS, S.C., MANTIS, N.J., CHEN, C.-Y., CHANG, C.-H. & HAN, D.C. Host recognition by the VirA, VirG two-component regulatory proteins of *Agrobacterium tumefaciens*. *Research Microbiology* 145:461-473. 1994.
- YANOFSKY, M.F., PORTER, S.G., YOUNG, C., ALBRIGHT, L.M., GORDON, M.P. & NESTER, E.W. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease. *Cell* 47:471-477. 1986.
- ZAENEN, I., VAN LAREBEKE, N., TEUCHY, H., VAN MONTAGU, M. & SCHELL, J. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal Molecular Biology* 15, 86:109-127. 1974.
- ZAMBRYSKI, P.C. Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annual Reviews Plant Physiology Plant Molecular Biology* 43:465-490. 1992.
- ZAMBRYSKI, P., TEMPÉ, J. & SCHELL, J. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* 56:193-201. 1989.
- ZHU, J., OGER, P.M., SCHRAMMEIJER, B., HOOYKAAS, P.J.J., FARRAND, S.K. & WINANS, S.C. The bases of crown gall tumorigenesis. *Journal of Bacteriology* 182:3885-3895. 2000.
- ZIEMIENOWICZ, A. Odyssey of *Agrobacterium* T-DNA. *Acta Biochimica Polonica* 48:623-635. 2001.
- ZIEMIENOWICZ, A., MERKLE, T., SCHOUMACHER, F., HOHN, B. & ROSSI, L. Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins. *The Plant Cell* 13:369-384. 2001.
- ZUPAN, J.R. & ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology* 107:1041-1047. 1995.
- ZUPAN, J.R., CITOVSKEY, V. & ZAMBRYSKI, P. *Agrobacterium* VirE2 protein mediates nuclear uptake of single-stranded DNA in plant cells. *Cell Biology* 93:2392-2397. 1996.
- ZUPAN, J.R., WARD, D. & ZAMBRYSKI, P. Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Current Opinion in Microbiology* 1:649-655. 1998.
- ZUPAN, J., WARD, D. & ZAMBRYSKI, P. Inter-kingdom DNA transfer decoded. *Nature Biotechnology* 20:129-131. 2002.
- ZUPAN, J., MUTH, T.R., DRAPER, O. & ZAMBRYSKI, P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* 23:11-28. 2000.